

7. 배추 Dehydroascorbate reductase (DHAR) 유전자를 이용한 담배의 형질전환

이인애 · 신재천[○] · 이효신* · 김기용*¹ · 조진기

경북대학교 동물공학과, 영남농업시험장*, 축산기술연구소*¹

항산화 기구의 강화가 형질전환 식물의 환경 스트레스에 대한 내성 획득에 미치는 영향을 연구하기 위하여 항산화 효소계의 중심효소 중 하나인 Dehydroascorbate reductase (DHAR) 유전자의 형질전환을 시도하였다. DHAR 유전자는 시금치의 cytosolic DHAR cDNA의 염기서열을 근거로 primer를 합성, RT-PCR로 증폭 산물을 얻어 pGEM-T vector에 subcloning (*Dhar6*)하였다. 염기서열 확인한 후 이를 probe로 하여 배추 cDNA library에서 선발한 clone을 식물체 형질전환용 binary vector pIG 121-Hm의 CaMV 35S promoter 하류에 삽입하여 형질전환용 발현벡터인 pIGD-12를 구축한 다음, *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 도입하여 형질전환 된 clones (*ApD-6*, *ApD-8*)을 얻었다. 이들 clone의 배양액에 담배 잎 disc를 20분 정도 담귀 감염시킨 후, 2 mg/L BAP, 30 g/L sucrose, 0.2 mg/L NAA, 5 g/L gelrit가 첨가된 MS-n/b 배지에서 28°C, 3일 동안 암 상태로 공동 배양하여 감염을 유도하였다. 감염시킨 담배 잎 disc의 선발을 위해서 250 mg/L cefataxime과 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS-n/b 배지에서 4주 동안 명 상태에서 배양하여 선발하였다. 선발된 shoot을 항생제가 첨가된 1/2 strength의 MS-n/b 배지로 기내 배양하여 뿌리를 유도하여 완전한 식물체로 재분화시킨 다음, 순화과정을 거쳐 화분에 옮겨 완전한 식물체로 생육시킨 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 및 Southern blot 분석을 실시하여 이들 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 또한 과발현 정도에 따른 오존, paraquat, H₂O₂, 등에 대한 내성 획득여부를 확인 중에 있다.

Key words ; 항산화 기구, Dehydroascorbate reductase, 형질전환, *Agrobacterium*.

8. Paraquat 내성 유전자(*pqrA*)의 이탈리아 라이그래스 (*Lolium multiflorum* Lam.)로의 도입

배은경[○] · 원성혜 · 이효신* · 이인애 · 이승민 · 김기용*¹ · 조진기

경북대학교 동물공학과, 영남농업시험장*, 축산기술연구소*¹

제초제인 paraquat에 대하여 내성을 가지는 목초의 개발을 위하여 토양미생물인 *Orcharobacterium anthropi*로부터 분리한 paraquat 내성유전자(*pqrA*)를 이탈리아 라이그래스에 도입하였다.

GUS 유전자를 제거한 binary vector인 pIG121-Hm에 *pqrA* 유전자를 도입하여 재조합된 vector, pIG-pqrA를 구축하였다. pIG-pqrA를 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101에 도입한 후 이탈리아 라이그래스의 형질전환에 이용하였다. 이탈리아 라이그래스의 “Jeanne”의 배반조직 유래의 캘러스를 *Agrobacterium*으로 감염시킨 다음, Hygromycin이 첨가된 선발배지에서 선발·증식된 캘러스로부터 이탈리아 라이그래스의 재분화를 유도하였다. 재분화된 이탈리아 라이그래스의 잎으로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 PCR증폭을 통하여 이탈리아 라이그래스의 *pqrA* 유전자의 도입을 확인하였다.

Key words : *Agrobacterium*, Italian ryegrass, *Orchobactrum anthropi*, paraquat, 형질전환

9. 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)의 품종에 따른 종자유래의 캘러스 형성률과 식물체 재분화율의 비교

배은경 · 김유리^o · 이효신* · 이인애 · 강경민 · 김기용*¹ · 조진기

경북대학교 동물공학과, 영남농업시험장*, 축산기술연구소*¹

형질전환에 효율적인 오차드그래스 품종을 선별하기 위하여 오차드그래스의 31품종에 대한 캘러스유도 및 식물체 재분화율을 조사하였다. 재료 식물은 축산기술연구소에서 분양받은 31품종을 사용하였고, 캘러스유도 배지로는 MS배지(MS+ L당 sucrose 30 g, casein 1 g, thiamin 1 mg, myo-Inositol 0.25 g, proline 0.69 g, Gellan gum 5 g 및 9 μM 2,4-D, 5 μM copper, 0.044 μM BAP, pH 5.8)를 사용하였다. 재분화 배지로는 MS배지 (MS+ L당 sucrose 20 g, sorbitol 20 g, maltose 20g, NAA 1 mg, kinetin 5 mg, Gellan gum 5 g/L 및 10 μM copper, pH 5.8)를 사용하였다. 종피를 제거한 오차드그래스의 종자를 캘러스유도 배지에서 배양하여 얻은 캘러스의 크기와 형성률을 확인하였다. 공시품종 중 “93M”이 크기가 가장 크고 캘러스 형성율이 가장 좋았으며 다음은 “Sparta”, “Justus”, “Condor”, “Potomac”의 순이었다. 이들로부터 얻어진 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 재분화율을 확인한 결과 “Justus”, “Tna”가 가장 높았으며, 그 다음으로는 “Potomac”, “Benchmac”, “합성 18호”의 순이었다. 위의 결과로부터 형질전환에 가장 효율적인 오차드그래스의 품종은 “Justus”와 “Potomac”임을 알아내었다.

Key words : 오차드그래스, 캘러스, 식물체 재분화